

Kopi instan





© BSN 2014

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN  
Gd. Manggala Wanabakti  
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.  
Telp. +6221-5747043  
Fax. +6221-5747045  
Email: [dokinfo@bsn.go.id](mailto:dokinfo@bsn.go.id)  
[www.bsn.go.id](http://www.bsn.go.id)

Diterbitkan di Jakarta



## Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata .....	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Acuan normatif.....	1
3 Istilah dan definisi .....	1
4 Bahan baku.....	1
5 Syarat mutu .....	1
6 Pengambilan contoh .....	2
7 Cara uji .....	3
8 Syarat lulus uji .....	3
9 Higiene.....	3
10 Pengemasan.....	3
11 Syarat penandaan .....	3
Lampiran A (normatif) Cara uji kopi instan .....	4
Bibliografi .....	31



## Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) *Kopi instan* ini merupakan revisi SNI 01 – 2983 – 1992 *Kopi instan*. Standar ini direvisi dan dirumuskan dengan tujuan sebagai berikut:

- Menyesuaikan standar dengan perkembangan teknologi terutama dalam metode uji dan persyaratan mutu;
- Menyesuaikan standar dengan peraturan-peraturan baru yang berlaku;
- Melindungi kesehatan dan kepentingan konsumen;
- Menjamin perdagangan pangan yang jujur dan bertanggung jawab;
- Mendukung perkembangan dan diversifikasi produk industri kopi instan.

Standar ini dirumuskan dengan memperhatikan ketentuan pada :

1. Undang-Undang Republik Indonesia No. 5 Tahun 1984 tentang Perindustrian;
2. Undang-Undang Republik Indonesia No. 7 Tahun 1996 tentang Pangan;
3. Undang-Undang Republik Indonesia No. 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen;
4. Undang-Undang Republik Indonesia No. 36 Tahun 2009 tentang Kesehatan;
5. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No. 69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan;
6. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No. 28 Tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu, dan Gizi Pangan;
7. Peraturan Menteri Perindustrian Republik Indonesia Nomor 75/M-IND/PER/7/2010 tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik;
8. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No. 033/ 2012, tentang Bahan Tambahan Pangan;
9. Surat Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.05.52.4040 Tahun 2006 tentang Kategori Pangan;
10. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.06.1.52.4011 Tahun 2009 tentang Penetapan Batas Maksimum Cemaran Mikroba dan Kimia dalam Makanan.

Standar ini dirumuskan oleh Subpanitia Teknis 67-04-S1, *Minuman* yang telah dibahas melalui rapat teknis, dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 9 Juli 2013 di Jakarta. Hadir dalam rapat tersebut wakil dari konsumen, produsen, lembaga pengujian, lembaga ilmu pengetahuan dan teknologi, Badan Pengawas Obat dan Makanan, dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 27 September 2013 sampai dengan 25 November 2013 dengan hasil akhir RASNI.



## Kopi instan

### 1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan istilah dan definisi, syarat mutu, pengambilan contoh, dan cara uji kopi instan.

### 2 Acuan normatif

SNI 0428, *Petunjuk pengambilan contoh padatan*.

SNI ISO 6887-1:2012, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Penyiapan contoh uji, suspensi awal dan pengenceran desimal untuk pengujian mikrobiologi – Bagian 1 : aturan umum untuk penyiapan suspensi awal dan pengenceran decimal*.

SNI ISO 6887-4:2012, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Penyiapan contoh uji, suspensi awal dan pengenceran desimal untuk pengujian mikrobiologi – Bagian 4 : aturan khusus untuk penyiapan produk lain selain susu dan produk susu, daging dan produk daging, dan ikan serta produk perikanan*.

SNI ISO 21527-2: 2012, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Metode horizontal untuk enumerasi kapang dan khamir – Bagian 2: Teknik penghitungan koloni pada produk dengan aktivitas air kurang dari atau sama dengan 0,95*.

### 3 Istilah dan definisi

#### 3.1

##### **kopi instan**

produk kopi berbentuk serbuk atau granula atau *flake* yang diperoleh dari proses pemisahan biji kopi tanpa dicampur dengan bahan lain, disangrai, digiling, diekstrak dengan air, dikeringkan dengan proses *spray drying* (dengan atau tanpa aglomerasi) atau *freeze drying* atau *fluidized bed drying* menjadi produk yang mudah larut dalam air

#### 3.2

##### **kopi instan dekafein**

kopi instan yang sebagian besar telah dikurangi kandungan kafeinnya melalui proses ekstraksi tertentu

### 4 Bahan baku

Biji kopi.

### 5 Syarat mutu

Syarat mutu kopi instan sesuai Tabel 1 di bawah ini.



Tabel 1 – Syarat mutu kopi instan

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
1	Keadaan		
1.1	Bau	-	Normal
1.2	Warna	-	Normal
2	Air	% (b/b)	maks. 4*/maks. 5**
3	Abu	% (b/b)	6 - 14
4	Kafein	%	min. 2,5 ***/ maks. 0,3****
5	Otentisitas kopi		
5.1	Total Glukosa	%	maks. 2,46
5.2	Total Xylosa	%	maks. 0,45
6	Kelarutan dalam air panas/dingin	-	larut dalam 30 detik/3 menit
7	Cemaran logam		
7.1	Timbal (Pb)	mg/kg	maks. 2,0
7.2	Kadmium (Cd)	mg/kg	maks. 0,2
7.3	Timah (Sn)	mg/kg	maks. 40,0 / maks. 250,0*****
7.4	Merkuri (Hg)	mg/kg	maks. 0,03
8	Cemaran arsen (As)	mg/kg	maks. 1,0
9	Cemaran mikroba		
9.1	Angka lempeng total	koloni/g	maks. $3 \times 10^3$
9.2	Kapang dan khamir	koloni/g	maks. $1 \times 10^2$
10	Okratoksin A	µg/kg	maks. 10
<b>CATATAN:</b> * Pengujian dengan metode <i>oven vaccum</i> ** Pengujian dengan metode <i>Karl Fischer</i> *** Kadar kafein kopi instan **** Kadar kafein kopi instan dekafein ***** Kadar Sn kopi instan yang dikemas dalam kaleng			

## 6 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh sesuai dengan SNI 0428.



## 7 Cara uji

Cara uji untuk kopi instan seperti di bawah ini:

- a) Persiapan contoh sesuai Lampiran A.1;
- b) Cara uji keadaan sesuai Lampiran A.2;
  - Cara uji bau sesuai Lampiran A.2.1
  - Cara uji warna sesuai Lampiran A.2.2
- c) Cara uji kadar air sesuai Lampiran A.3;
- d) Cara uji kadar abu sesuai Lampiran A.4;
- e) Cara uji kafein sesuai Lampiran A.5;
- f) Cara uji total glukosa dan total xylosa sesuai Lampiran A.6;
- g) Cara uji kelarutan sesuai Lampiran A.7;
- h) Cara uji cemaran logam sesuai Lampiran A.8;
  - Cara uji timbal (Pb) dan kadmium (Cd) sesuai Lampiran A.8.1
  - Cara uji timah (Sn) sesuai Lampiran A.8.2
  - Cara uji merkuri (Hg) sesuai Lampiran A.8.3
- i) Cara uji cemaran arsen (As) sesuai Lampiran A.9;
- j) Cara uji cemaran mikroba sesuai Lampiran A.10;
  - Persiapan dan homogenisasi contoh sesuai Lampiran A.10.1, SNI ISO 6887-1: 2012, SNI ISO 6887-4: 2012;
  - Cara uji angka lempeng total sesuai Lampiran A.10.2
  - Cara uji kapang dan khamir sesuai SNI ISO 21527-2: 2012
- k) Cara uji okratoksin sesuai Lampiran A.11.

## 8 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu sesuai Pasal 5.

## 9 Higiene

Cara memproduksi produk yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganannya sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik.

## 10 Pengemasan

Produk dikemas dalam wadah yang tertutup rapat, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

## 11 Syarat penandaan

Syarat penandaan sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang label dan iklan pangan.



**Lampiran A**  
(normatif)  
**Cara uji kopi instan**

**A.1 Persiapan contoh**

Persiapan contoh terdiri atas persiapan contoh untuk uji mikrobiologi, uji organoleptik, dan uji kimia. Pengambilan contoh untuk uji mikrobiologi dilakukan pertama, kemudian dilanjutkan dengan pengambilan contoh untuk uji organoleptik dan uji kimia.

**A.1.1 Persiapan contoh untuk uji mikrobiologi**

Buka kemasan contoh kopi instan dan ambil contoh secara aseptik sebanyak 400 g, kemudian tempatkan dalam botol contoh steril.

**A.1.2 Persiapan contoh untuk uji organoleptik**

Buka kemasan contoh kopi instan dan ambil contoh secukupnya, kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

**A.1.3 Persiapan contoh untuk uji kimia**

Buka kemasan contoh kopi instan dan ambil contoh sebanyak 400 g, kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

**A.2 Keadaan**

**A.2.1 Bau**

**A.2.1.1 Prinsip**

Pengamatan contoh uji dengan indera penciuman yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian organoleptik.

**A.2.1.2 Cara kerja**

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) cium contoh uji untuk mengetahui baunya; dan
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis yang terlatih atau 1 orang tenaga ahli.

**A.2.1.3 Cara menyatakan hasil**

- a) Jika tidak tercium bau asing, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- b) jika tercium bau asing, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

**A.2.2 Warna**

**A.2.2.1 Prinsip**

Pengamatan contoh uji dengan indera penglihatan yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian organoleptik.



**A.2.2.2 Cara kerja**

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) Amati warna contoh uji; dan
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis yang terlatih atau 1 orang tenaga ahli.

**A.2.2.3 Cara menyatakan hasil**

- a) Jika tidak terlihat warna asing, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- b) jika terlihat warna asing, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

**A.3 Kadar air**

Kadar air (kehilangan bobot selama pengeringan) dapat dihitung menggunakan salah satu dari dua metode berikut ini (metode oven vakum atau metode Karl Fischer)

**A.3.1 Metode oven vakum****A.3.1.1 Prinsip**

Kadar air dihitung berdasarkan bobot yang hilang selama pemanasan dalam oven vakum pada suhu  $70 \pm 1$  °C dengan tekanan  $5000 \text{ N/m}^2$  Pa (37,5 mmHg).

**A.3.1.2 Peralatan**

- a) Oven terkalibrasi;
- b) Oven vakum terkalibrasi dengan pompa vakum bertekanan maksimum  $5000 \text{ N/m}^2$  (Pa) (37,5 mmHg);
- c) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) Desikator yang berisi desikan; dan
- e) Pinggan aluminium tertutup dengan diameter 50 mm dan tinggi/ kedalaman 20 sampai dengan 30 mm.

**A.3.1.3 Cara kerja**

- a) Panaskan pinggan aluminium beserta tutupnya dalam oven pada suhu 100 °C sampai dengan 105 °C selama 1 jam, kemudian dinginkan dalam desikator selama 20 menit sampai dengan 30 menit, kemudian timbang dengan neraca analitik ( $W_0$ );
- b) masukkan 3 g contoh ke dalam pinggan, sebarkan secara seragam pada dasar dan tutup pinggan, tutup, pindahkan pada desikator, dan timbang ( $W_1$ );
- c) panaskan pinggan yang berisi contoh tersebut dalam keadaan terbuka dengan meletakkan tutup pinggan di samping pinggan di dalam oven vakum. Tutup oven dan kurangi tekanan secara perlahan (selama 2 menit) menjadi  $5000 \pm 1000 \text{ N/m}^2$  (37,5 mm). Keringkan selama  $16 \pm 0,5$  jam pada suhu oven vakum  $70 \pm 1$  °C dengan kecepatan udara 1 gelembung/ detik, tutup katup pada pompa dan masukkan udara secara perlahan (selama 2 menit) pada oven;
- d) buka oven, tempatkan tutup pinggan pada pinggan, tempatkan pada desikator, dinginkan, kemudian timbang ( $W_2$ );
- e) lakukan pekerjaan duplo; dan
- f) hitung kadar air (bobot yang hilang selama pengeringan) dalam contoh.



#### A.3.1.4 Perhitungan

$$\text{Kadar air (\%)} = \left( \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \right) \times 100\%$$

**Keterangan:**

$W_0$  adalah bobot pinggan kosong dan tutupnya, dinyatakan dalam gram (g);

$W_1$  adalah bobot pinggan, tutupnya dan contoh sebelum dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g);

$W_2$  adalah bobot pinggan, tutupnya dan contoh setelah dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g).

#### A.3.1.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5% dari nilai rata-rata hasil kadar air. Jika kisaran lebih besar dari 5%, maka uji harus diulang kembali.

### A.3.2 Metode Karl Fischer

#### A.3.2.1 Prinsip

Pada perangkat Karl Fischer, contoh uji dilarutkan pada larutan bebas air yang terdiri dari formamide, metanol, dan asam salisilat (FMS). Titrasi dilanjutkan dengan pereaksi Karl Fischer yang terdiri dari iodine, sulfurdioksida, piridin, dan metanol, dalam kondisi terus teraduk sampai titik akhir titrasi tercapai dan dapat terdeteksi secara elektrometrik. Iodin akan direduksi oleh sulfuroksida dengan adanya piridin dan metanol selama adanya air pada contoh. Volume pereaksi Karl Fischer yang terpakai untuk titrasi digunakan untuk menghitung kadar air pada contoh uji.

#### A.3.2.2 Peralatan

- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Perangkat titrasi;
- Peralatan titrasi Karl Fischer manual atau otomatis, dengan 2 elektroda Pt dan pengaduk;
- Bejana titrasi kapasitas 100 mL yang sedikitnya terdiri dari 4 sambungan, yang pertama tersambung dengan buret, yang kedua tersambung dengan 2 elektroda Pt, yang ketiga untuk penambahan larutan FMS, dan yang keempat untuk memasukkan contoh uji;
- Buret terkalibrasi dengan ketelitian 0,01 mL, penampung, dan wadah pengeringan;
- Syringe;
- Sendok timbang tertutup terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg; dan
- Erlenmeyer tertutup 50 mL.

#### A.3.2.3 Pereaksi

- Pereaksi Karl Fischer, titrasi secara teliti 5 mg/mL, konsentrasi massa air, bebas piridin ;
- Methanol, dengan konsentrasi air rendah, diutamakan yang kurang dari < 0,5 mg/mL;
- Formamide, dengan konsentrasi air rendah;
- Salicylic (2-hydroxybenzoic) acid*; dan
- Disodium tartrate (disodium 2,3-dihydroxybutanedioate) dihydrate*.



### A.3.2.4 Cara kerja

#### A.3.2.4.1 Preparasi campuran *formamide-methanol-salicylic acid* (FMS)

- Sebanyak 6 g *salicylic acid* dilarutkan dalam 20 mL *methanol* pada tabung reaksi bertutup dalam kondisi teraduk secara kontinu, kemudian tambahkan 10 mL formamide, kemudian bejana ditutup dan campuran FMS dihomogenisasi dengan diaduk;
- pindahkan 30 mL FMS ke dalam bejana titrasi dan biarkan untuk dikondisikan selama 20 menit, selama waktu tersebut terjadi penghilangan residu air;
- parameter standar elektrometrik adalah polarisasi saat ini,  $I_{pol}$ , 50 pA, titrasi berhenti pada sekitar 60 sampai dengan 80%, dengan waktu tunggu 30 detik, instruksi dari manufaktur untuk penggunaan baik peralatan maupun pereaksi harus dipatuhi.

#### A.3.2.4.2 Penetapan titer pereaksi Karl Fischer

##### A.3.2.4.2.1 Penetapan dengan *disodium tartrat dihydrate*

- Timbang secara teliti 0,12 g *disodium tartrat dihydrate* pada sendok penimbang bertutup untuk menetapkan bobot kotor ( $W_1$ ), kemudian pindahkan pada bejana titrasi yang berisi campuran FMS bebas air yang telah dikondisikan;
- tutup bejana titrasi kemudian mulai proses titrasi dalam kondisi pengadukan kontinu;
- timbang kembali sendok penimbang untuk menterakan ( $W_0$ );
- pada akhir titrasi, catat volume pereaksi Karl Fischer yang digunakan ( $V$ ).

##### A.3.2.4.2.2 Penetapan dengan air (metode alternatif)

- Penuhi *syringe* dengan air, keluarkan sekitar 0,2 mL, dan setelah permukaan jarum suntik kering, timbang *syringe* pada neraca analitik;
- masukkan jarum *syringe* melalui sambungan pada bejana titrasi, pada saat jarum hampir mencapai permukaan larutan, suntikkan secara teliti 25 mg sampai dengan 30 mg air ke dalam penerima FMS;
- air harus ditambahkan dengan cepat, usahakan untuk mengurangi pengaruh kelembaban udara ambien, dalam rangka mempercepat penambahan air, jumlah air yang menetes ekuivalen dengan berat air yang dibutuhkan harus ditetapkan pada percobaan awal dengan *syringe*;
- tutup kembali bejana titrasi kemudian segera lakukan titrasi dalam kondisi pengadukan kontinu;
- timbang kembali *syringe* untuk menterakan;
- pada akhir titrasi catat volume pereaksi Karl Fischer yang digunakan untuk mentitrasi ( $V$ ).

##### A.3.2.4.2.3 Perhitungan titer

$$\rho_{KF} = \frac{W_{H_2O}}{V}$$

#### Keterangan

- $\rho_{KF}$  adalah titer pereaksi Karl Fischer, dinyatakan dalam miligram (mg) air per mililiter (mL) pereaksi Karl Fischer;
- $W_{H_2O}$  adalah bobot air untuk titer, yaitu bobot kotor air dikurangi bobot tera, dinyatakan dalam miligram (mg); dan
- $V$  adalah volume pereaksi Karl Fischer yang digunakan, dinyatakan dalam mililiter (mL).



Bila menggunakan *disodium tartrat dihydrate*, bobot tartrat dihitung sebagai:

$$W_{H_2O} = 0,1566 W_T$$

**Keterangan:**

$W_T$  adalah bobot tartrat sebagai hasil pengurangan bobot kasar dengan tera, dinyatakan dalam miligram (mg).

#### A.3.2.4.3 Pengujian contoh uji

- Tempatkan 30 mL FMS pada bejana titrasi dan lakukan pengkondisian melalui pre titrasi;
- timbang secara teliti sebanyak 300 mg sampai dengan 500 mg contoh uji kopi instan ( $W_1$ ), kemudian pindahkan ke dalam bejana titrasi;
- tutup bejana titrasi dan segera mulai tahapan titrasi tanpa mengubah parameter titrasi sampai dengan titik akhir titrasi ( $V_1$ );
- untuk menghindari kelembaban udara ambien, sendok penimbang harus selalu dalam kondisi tertutup.

#### A.3.2.5 Perhitungan

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{\rho_{KF} \times V_1}{10 W_1}$$

**Keterangan:**

$\rho_{KF}$  adalah titer pereaksi Karl Fischer, dinyatakan dalam miligram (mg)  $H_2O$ / mililiter (mL) pereaksi Karl Fischer;;

$V_1$  adalah volume pereaksi Karl Fischer untuk titrasi contoh uji, dinyatakan dalam mililiter (mL);

$W_1$  adalah bobot contoh uji, dinyatakan dalam miligram (mg).

#### A.3.2.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 10% dari nilai rata-rata hasil kadar air. Jika kisaran lebih besar dari 10%, maka uji harus diulang kembali.

### A.4 Abu

#### A.4.1 Prinsip

Kadar abu dihitung berdasarkan bobot abu yang terbentuk selama pembakaran dalam tanur pada suhu 525 °C sampai terbentuk abu berwarna putih.

#### A.4.2 Peralatan

- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Desikator yang berisi desikan; dan
- Cawan porselen/kuarsa volume 30 mL hingga 50 mL.

#### A.4.3 Cara kerja

- Panaskan cawan dalam tanur pada suhu 525 °C selama kurang lebih satu jam dan dinginkan dalam desikator sehingga suhunya sama dengan suhu ruang kemudian timbang dengan neraca analitik ( $W_0$ );
- masukkan 3 g sampai dengan 5 g contoh ke dalam cawan dan timbang ( $W_1$ );



- c) tempatkan cawan yang berisi contoh tersebut dalam tanur pada suhu 525 °C sampai terbentuk abu berwarna putih dan diperoleh bobot tetap;
- d) pindahkan segera ke dalam desikator sehingga suhunya sama dengan suhu ruang kemudian timbang ( $W_2$ );
- e) lakukan pekerjaan duplo; dan
- f) hitung abu dalam contoh.

#### A.4.4 Perhitungan

$$\text{Kadar Abu (\%)} = \left( \frac{W_2 - W_0}{W_1 - W_0} \right) \times 100 \%$$

##### Keterangan:

$W_0$  adalah bobot cawan kosong, dinyatakan dalam gram (g);

$W_1$  adalah bobot cawan dan contoh sebelum diabukan, dinyatakan dalam gram (g);

$W_2$  adalah bobot cawan dan contoh setelah diabukan, dinyatakan dalam gram (g).

#### A.4.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil perhitungan abu. Jika kisaran lebih besar dari 5 %, maka uji harus diulang kembali.

### A.5 Kafein

Kadar kafein dapat dihitung menggunakan salah satu dari dua metode berikut ini (metode spektrofotometri atau metode kromatografi cair kinerja tinggi)

#### A.5.1 Metode spektrofotometri

##### A.5.1.1 Prinsip

Ekstraksi kafein dari contoh uji menggunakan pelarut organik (kloroform), kafein yang terekstraksi kemudian dihitung dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 276 nm.

##### A.5.1.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer;
- b) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- c) Erlenmeyer 500 mL;
- d) Labu kocok 125 mL;
- e) Labu ukur 100 mL terkalibrasi;
- f) Pipet volumetrik 10 mL terkalibrasi; dan
- g) Corong

##### A.5.1.3 Pereaksi

- a) Akuades;
- b) Magnesium oksida, MgO;
- c) Kalium permanganat,  $\text{KMnO}_4$  1,5%;
- d) Larutan pereduksi;  
larutkan 5 g Natrium sulfit ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) dan 5 g Kalium rodanida ( $\text{KSCN}$ ) dengan air suling di dalam labu ukur 100 mL sampai tanda garis.
- e) Kloroform,  $\text{CHCl}_3$ ;



- f) Larutan asam pospat,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ;  
larutkan 15 mL  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ke dalam 85 mL air suling.
- g) Larutan natrium hidroksida,  $\text{NaOH}$ ;  
larutkan 25 g  $\text{NaOH}$  dalam 75 mL air suling.
- h) Larutan standar kafein 10 mg kafein/mL;  
timbang secara teliti 100 mg ke dalam labu ukur 100 mL, larutkan dengan  $\text{CHCl}_3$  sampai tanda garis. Larutkan 10 mL dari alikuot dengan 100 mL  $\text{CHCl}_3$ . Selanjutnya larutkan 10 mL alikuot dengan 100 mL, dan 50 mL  $\text{CHCl}_3$ .
- i) Larutan standar kafein 20 mg kafein/mL;  
timbang secara teliti 100 mg ke dalam labu ukur 100 mL, larutkan dengan  $\text{CHCl}_3$  sampai tanda garis. Larutkan 10 mL dari alikuot dengan 100 mL  $\text{CHCl}_3$ . Selanjutnya larutkan 20 mL alikuot dengan 100 mL  $\text{CHCl}_3$ .
- j) Larutan standar kafein 30 mg kafein/mL; dan  
timbang secara teliti 100 mg ke dalam labu ukur 100 mL, larutkan dengan  $\text{CHCl}_3$  sampai tanda garis. Larutkan 10 mL dari alikuot dengan 100 mL  $\text{CHCl}_3$ . Selanjutnya larutkan 15 mL alikuot dengan 50 mL  $\text{CHCl}_3$ .
- k) Air suling.

#### A.5.1.4 Cara kerja

- a) Timbang secara seksama 0,1 sampai dengan 1 g contoh (W) ke dalam erlenmeyer 500 mL yang telah diketahui bobotnya, tambahkan 5 g serbuk  $\text{MgO}$ ;
- b) tambahkan 150 mL sampai dengan 200 mL air suling, panaskan hingga mendidih, didihkan selama 45 menit sambil sesekali diaduk. Tambahkan air jika perlu, bobot akhir air suling harus 100 g;
- c) dinginkan pada suhu kamar, timbang, bobotnya harus bobot erlenmeyer kosong ditambah 105 g (100 g air ditambah 5 gram  $\text{MgO}$ ) dan bobot contoh;
- d) langsung saring 50 mL secara bertahap sampai tepat didapat 50 mL larutan (setara dengan setengah contoh uji);
- e) pindahkan larutan ke labu pemisah, cuci (bilas) secara bertahap dengan 2 mL  $\text{H}_2\text{O}$ , tambahkan hasil pembilasan ke dalam labu pemisah, kemudian tambahkan 4 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ;
- f) ekstrak dengan 10 mL  $\text{CHCl}_3$  sebanyak 5 kali, setiap ekstraksi dikocok dengan kuat dan dilakukan selama 1 menit, biarkan larutan memisah dan alirkan  $\text{CHCl}_3$  ke dalam labu pemisah;
- g) tambahkan 5 mL larutan  $\text{KOH}$  1% (v/v), kocok dengan kuat selama 1 menit dan biarkan emulsi memisah;
- h) alirkan  $\text{CHCl}_3$  melalui penyumbat kapas ke dalam labu Kjeldahl 100 mL, ekstrak larutan  $\text{KOH}$  dengan 5 mL  $\text{CHCl}_3$ , dan tambahkan ke labu Kjeldahl;
- i) tambahkan  $1,9 \pm 0,1$  g  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $40 \pm 10$  mg  $\text{HgO}$ , dan  $2,0 \pm 0,1$  mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ke dalam labu digesti;
- j) tambahkan batu didih dan bilas leher bagian bawah labu dengan 3 mL  $\text{CHCl}_3$ , tempatkan labu pada rak digesti dan proses menurut metode Kjeldahl;
- k) untuk 1 mL asam 0,02 M
- l) lakukan pengerjaan duplo;
- m) hitung kandungan kafein dalam contoh.

#### A.5.1.5 Perhitungan

$$\text{Kadar kafein (\%)} = \frac{C}{W} \times V \times fp \times 100\%$$

##### Keterangan:

- C adalah konsentrasi kafein dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per miliiliter ( $\mu\text{g/mL}$ );
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
- W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
- fp adalah faktor pengenceran.



### A.5.1.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar kafein. Jika kisaran lebih besar dari 5 %, maka uji harus diulang kembali.

## A.5.2 Metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT)

### A.5.2.1 Prinsip

Kafein diekstrak dari contoh uji dengan air bersuhu 90 °C dengan adanya magnesium oksida. Setelah penyaringan, kandungan kafein pada ekstrak ditetapkan dengan menggunakan KCKT pada kolom RP-18 menggunakan elusi *isocratic* dengan deteksi sinar UV pada panjang gelombang 272 nm.

### A.5.2.2 Peralatan

- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Membrane filter unit* dengan ukuran pori 0,45 µm, untuk menyaring fase gerak dan melarutkan ekstrak contoh uji;
- Unit KCKT, menggunakan elusi *isocratic* dengan detektor UV yang diatur pada panjang gelombang 272 nm (270 sampai dengan 280 nm) atau detektor filter (254 nm), dan dengan sistem pengumpul data/ sistem integrasi, dapat menggunakan *degasser* atau tidak;
- Kolom kromatografi untuk KCKT, dengan ukuran panjang minimum 125 mm, dikemas dengan materi C18, dengan ukuran partikel 5 µm berbentuk bulat, dengan efisiensi pemisahan sedikitnya 5000 plat secara teoritis. Jumlah plat teoritis dapat dihitung dengan perhitungan sebagai berikut:

$$N_{th} = \left( \frac{t_R}{b} \right)^2 \times 5,54$$

#### Keterangan:

$N_{th}$  adalah jumlah plat teoritis pada kolom KCKT;

$t_R$  adalah waktu retensi *peak*, dinyatakan dalam detik; dan

$b$  adalah lebar *peak* pada ketinggian setengah puncak, dinyatakan dalam detik;

- Pengaduk magnetik dengan pemanas atau penangas air;
- Ultrasonic bath*;
- Microlitre syringe*;
- Penggiling kopi;
- Penggiling dengan roda bergerigi;
- Saringan berukuran lubang 630 µm;
- Labu ukur berukuran 250 mL dan 1 L terkalibrasi; dan
- Pipet volumetrik berukuran 50 mL dan 5 mL terkalibrasi.

### A.5.2.3 Pereaksi

- Methanol*, untuk KCKT;
- Magnesium oxide (MgO) murni;
- Kafein (1,3,7-trimethylxanthine; 1,3,7-trimethyl-1H-purine-2,6(3H,7H)-dione; *methyltheobromine* (C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>) anhidrat;
- Fase gerak, 24% volume fraksi metanol dalam air;
- Larutan standar kafein;



- f) Larutan stok, 200 mg/L;  
timbang sebanyak  $(0,200 \pm 0,001)$  g kafein anhidrat ke dalam labu ukur berukuran 1 L. Tambahkan air hangat sampai setengah labu ukur, kocok untuk melarutkan kafein, dinginkan pada suhu ruang, kemudian tepatkan dengan air sampai tanda tera, dan kocok.
- g) Larutan standar untuk kopi berkafein, sesuai dengan sekitar 40 mg/L;  
pipet 50 mL larutan stok standar kafein (A.5.2.3.f) ke dalam labu ukur 250 mL, tepatkan sampai tanda tera dengan air. Siapkan larutan standar segar setiap kali melakukan uji.
- h) Larutan standar untuk kopi dekafein, sesuai dengan sekitar 4 mg/L ;  
pipet 5 mL larutan stok standar kafein (A.5.2.3.f) ke dalam labu ukur 250 mL, tepatkan sampai tanda tera dengan air. Siapkan larutan standar segar setiap kali melakukan uji.
- i) Plot kalibrasi.  
penggunaan tiga sampai dengan lima poin plot kalibrasi adalah pilihan. Direkomendasikan kisaran konsentrasi adalah 5 mg/L sampai dengan 25 mg/L untuk contoh kopi berkafein dan 0,5 mg/L sampai dengan 2,5 mg/L untuk contoh kopi dekafein.

#### A.5.2.4 Cara kerja

- a) Timbang secara teliti 0,5 g contoh kopi instan ( $W_s$ ), masukkan ke dalam labu ukur 250 mL (V);
- b) tambahkan 5 g MgO dan 200 mL air, tempatkan labu ukur pada penangas air dan pertahankan pada titik didih dan tunggu sampai larutan mencapai suhu setidaknya 90 °C;
- c) teruskan pemanasan labu ukur dalam penangas air selama 20 menit, kocok atau aduk sesekali;
- d) keluarkan labu ukur dari penangas air, dinginkan pada suhu ruang di bawah air mengalir, dan tepatkan volume sampai tanda tera dengan air, dan tunggu sampai padatan menjadi stabil;
- e) ambil aliquot dari larutan supernatan, dan saring dengan menggunakan filter berukuran pori 0,45  $\mu$ m, keluarkan sedikit beberapa mililiter cairan pertama;
- f) filtrat siap untuk diseparasi dengan KCKT.

#### A.5.2.5 Cara penetapan

- a) Atur KCKT dengan kondisi sebagai berikut:
  - Laju alir fase gerak : 1,0 mL / menit
  - Detektor UV dipasang pada 272 nm (atau 254 nm jika menggunakan detektor filter).  
Pastikan kisaran sensitivitas detektor cocok dengan *peak* pada larutan standar.
- b) pada saat laju alir fase gerak dan tekanan yang diharapkan stabil, biarkan sistem menyeimbangkan selama sedikitnya 10 menit;
- c) kemudian injeksikan 10  $\mu$ L larutan standar pada kolom dengan menggunakan *syringe*;
- d) selanjutnya diikuti dengan volume yang sama hasil ekstraksi contoh uji (A.5.2.4.f);
- e) pada saat digunakan larutan standar tunggal, injeksikan larutan standar tersebut pada interval reguler (biasanya setelah enam ekstrak contoh);
- f) setelah setiap tahap analisis dilakukan pembilasan sistem KCKT dan kolom dengan 50% volume fraksi metanol dan air, dan lepaskan kolom untuk selanjutnya disimpan.



### A.5.2.6 Perhitungan

$$\text{Kadar kafein (\%)} = \frac{A_s \rho_{st} V \times 100}{A_{st} W_s} = \frac{A_s \rho_{st} \times 25}{A_{st} W_s}$$

**Keterangan:**

- $A_{st}$  adalah luas area *peak* kafein pada larutan standar;  
 $A_s$  adalah luas area *peak* kafein pada larutan contoh;  
 $W_s$  adalah bobot contoh uji, dinyatakan dalam gram (g);  
 $V$  adalah volume ekstraksi larutan contoh, dinyatakan dalam liter (L); dan  
 $\rho_{st}$  adalah konsentrasi massa pada larutan standar kafein, dinyatakan dalam gram per liter (g/L).

**CATATAN** ketinggian *peak* dapat dijadikan sebagai luas area

### A.5.2.7 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan RSD (*relative standard deviation*) maksimal 16%. Jika RSD lebih besar dari 16%, maka analisis harus diulang kembali.

## A.6 Otentisitas kopi (total glukosa dan total xylosa)

### A.6.1 Prinsip

Otentisitas kopi instan (total glukosa dan total xylosa) ditetapkan melalui pemisahan karbohidrat yang terdapat pada ekstrak yang telah dihidrolisis menggunakan larutan asam klorida dan deteksi menggunakan kolom *high performance anion-exchange* (HPAE) yang menggunakan air murni sebagai eluen. Deteksi elektrokimia dari komponen terelusi oleh *pulsed amperometric detector* (PAD) dan kuantifikasi *peak* dibandingkan dengan standar gula glukosa dan xylosa.

### A.6.2 Peralatan

- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Labu ukur 100 mL terkalibrasi;
- Gelas ukur 50 mL dan 1 000 mL terkalibrasi;
- Sistem filtrasi vakum;
- Kertas saring;
- Cartridge disposable C18*;
- Membran filter *disposable* dengan ukuran pori 0,2 µm;
- Penangas air;
- Kromatograf cair bebas logam;  
dengan kolom HPAE dengan resin *pellicular polystyrene-divinylbenzentre* dan pre kolom (*guard column*) dan sistem *post column delivery*.
- Pulsed amperometric detector* (PAD);
- Integrator; dan
- Cartridge disposable*.

### A.6.3 Pereaksi

- Larutan sodium hidroksida (NaOH) 50% (b/b);
- Larutan standar volumetrik asam hidroklorida (HCl) 1,00 mol/L;
- Eluen 1 (S1) air demineral (18 MΩ.cm);  
Saring air demineral dengan membran filter 0,2 µm. Hilangkan gas dengan menggunakan helium selama 20 sampai dengan 30 menit.



- d) Eluen 2 (S2) larutan sodium hidroksida (NaOH) 300 mmol/L; dan Pipet 15 mL NaOH ke dalam 985 mL eluen 1.
- e) Larutan standar karbohidrat.

#### A.6.4 Cara kerja

##### A.6.4.1 Preparasi contoh uji

- a) Timbang secara seksama 300 mg contoh (W) dan masukkan ke dalam labu ukur 100 mL, tambahkan 50 mL asam klorida 1 mol/L dan aduk;
- b) panaskan labu beserta isinya dengan air mendidih selama 150 menit dan aduk perlahan setiap 30 menit;
- c) dinginkan labu kemudian tambahkan air sampai tanda tera;
- d) saring 5 mL sampai dengan 10 mL larutan dengan menggunakan *disposable cartridge*, dan buang beberapa mL yang disaring awal.

##### A.6.4.2 Analisis kromatografi

- a) Atur alat kromatografi, detektor, dan integrator, kemudian biarkan dalam kondisi stabil;
- b) saring larutan standar glukosa (untuk pengujian glukosa) atau standar xylosa (untuk pengujian xylosa) dan larutan contoh yang telah dipreparasi (A.6.4.1) dengan menggunakan membran filter 0,2 µm;
- c) injeksikan dengan volume yang sama standar yang telah disaring ( $V_0$ ) dan larutan contoh (V) yang sudah disaring ke dalam kromatografi dan pisahkan karbohidrat di bawah kondisi yang terdapat pada Tabel A.1 dan Tabel A.2.
- d) identifikasi dan kuantifikasi karbohidrat yang terdapat pada larutan contoh dengan membandingkan waktu retensi dan area yang ditunjukkan melalui *peak* yang diperoleh menggunakan larutan standar;
- e) injeksikan larutan standar setiap empat kali injeksi larutan contoh untuk melihat terjadinya perubahan pada waktu retensi atau integrasi *peak*.

**Tabel A.1 – Kondisi preparasi kolom**

Eluen	Waktu	Eluen S1 (mL)	Eluen S2 (mL)	Prosedur
Isokratik	0	100	0	mulai akuisisi data
	50,0	100	0	hentikan akuisisi data
	50,1	0	100	mulai <i>clean-up</i>
	65,0	0	100	hentikan <i>clean-up</i>
	65,1	0	100	mulai <i>re-equilibrium</i>
	80,0	0	100	hentikan <i>re-equilibrium</i>

**CATATAN:**

1. Waktu retensi dapat bervariasi dari satu kolom ke kolom lainnya. Mulai proses *clean-up* bila monosakarida akhir (ribosa) telah terelusi
2. Dimungkinkan untuk dilakukan 2 atau 3 kali injeksi larutan standar atau untuk meningkatkan waktu *re-equilibrium* untuk memperoleh pemisahan yang baik antara sukrosa dan xylosa



Tabel A.2 – Kondisi analisis

Injeksi	20 µm
Laju alir	1,0 mL/ menit
Penambahan <i>postcolumn</i>	Eluen S2 dengan laju alir 0,6 mL/menit
Suhu	Ambient
Detektor	Isi <i>reference cell</i> dengan Eluen S2 Gunakan kondisi optimum sesuai petunjuk pemakaian alat.

### A.6.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan karbohidrat (\%)} = \left( \frac{A \times W_0 \times V}{A_0 \times W \times V_0} \right) \times 100\%$$

#### Keterangan:

- A adalah luas area *peak* dari karbohidrat tunggal pada larutan contoh;  
 A<sub>0</sub> adalah luas area *peak* dari karbohidrat tunggal pada larutan standar;  
 W adalah bobot contoh uji dari larutan contoh sebagai basis kering, dinyatakan dalam gram (g);  
 W<sub>0</sub> adalah bobot karbohidrat pada larutan standar, dinyatakan dalam gram (g);  
 V adalah volume larutan contoh, dinyatakan dalam mililiter (mL);  
 V<sub>0</sub> adalah volume larutan standar, dinyatakan dalam mililiter (mL).

### A.6.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan RSD (*relative standard deviation*) maksimal 16%. Jika RSD lebih besar dari 16%, maka analisis harus diulang kembali.

## A.7 Kelarutan

### A.7.1.1 Prinsip

Kelarutan diamati berdasarkan waktu yang dibutuhkan untuk melarutkan contoh secara sempurna dengan air panas dan air dingin.

### A.7.1.2 Peralatan

- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Gelas piala 500 mL;
- Penangas air;
- Termometer;
- Pengaduk gelas; dan
- Stop watch*.

### A.7.1.3 Pelarut

- Air

### A.7.1.4 Cara kerja

#### A.7.1.4.1 Kelarutan pada air panas

- Timbang 2,5 g contoh (W<sub>0</sub>) kemudian masukkan ke dalam erlenmeyer 500 mL;
- masukkan 150 mL air mendidih, kemudian aduk merata;
- contoh uji harus melarut sempurna dalam waktu kurang dari 30 detik.



#### A.7.1.4.2 Kelarutan pada air dingin

- a) Timbang 2,5 g contoh ( $W_0$ ) kemudian masukkan ke dalam erlenmeyer 500 mL;
- b) masukkan 150 mL air bersuhu  $16 \pm 2$  °C, kemudian aduk merata;
- c) contoh uji harus melarut sempurna dalam waktu kurang dari 3 menit.

### A.8 Cemarkan logam

#### A.8.1 Timbal (Pb) dan kadmium (Cd)

##### A.8.1.1 Prinsip

Destruksi contoh dengan cara pengabuan kering pada 450 °C yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Logam yang terlarut dihitung menggunakan alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) dengan panjang gelombang maksimal 228,8 nm untuk Cd dan 283,3 nm untuk Pb.

##### A.8.1.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Cd dan Pb) terkalibrasi (sebaiknya menggunakan SSA tungku grafit);
- b) Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- c) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) Pemanas listrik;
- e) Penangas air;
- f) Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;
- g) Labu ukur 1 000 mL, 100 mL, dan 50 mL, terkalibrasi;
- h) Gelas ukur 10 mL;
- i) Gelas piala 250 mL;
- j) Botol polipropilen;
- k) Cawan porselen/platina/kwarsa 50 mL sampai dengan 100 mL; dan
- l) Kertas saring tidak berabu dengan *particle retention* 20  $\mu$ m sampai dengan 25  $\mu$ m.

##### A.8.1.3 Pereaksi

- a) Asam nitrat,  $\text{HNO}_3$  pekat;
- b) Asam klorida,  $\text{HCl}$  pekat;
- c) Larutan asam nitrat,  $\text{HNO}_3$  0,1 N;  
encerkan 7 mL  $\text{HNO}_3$  pekat dengan aquabides dalam labu ukur 1 000 mL sampai tanda garis.
- d) Larutan asam klorida,  $\text{HCl}$  6 N;  
encerkan 500 mL  $\text{HCl}$  pekat dengan aquabides dalam labu ukur 1 000 mL sampai tanda garis.
- e) Larutan baku 1 000  $\mu\text{g/mL}$  Cd;  
larutkan 1,000 g Cd dengan 7 mL  $\text{HNO}_3$  pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL kemudian encerkan dengan aquabides sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Cd 1 000  $\mu\text{g/mL}$  siap pakai.
- f) Larutan baku 200  $\mu\text{g/mL}$  Cd;  
pipet 10 mL larutan baku 1 000  $\mu\text{g/mL}$  Cd ke dalam labu ukur 50 mL kemudian encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 200  $\mu\text{g/mL}$  Cd.



- g) Larutan baku 20 µg/mL Cd;  
pipet 10 mL larutan baku 200 µg/mL Cd ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan akuabides sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 20 µg/mL Cd.
- h) Larutan baku kerja Cd;  
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,5 mL, 1 mL; 2 mL; 4 mL; 7 mL dan 9 mL larutan baku 20 µg/mL kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO<sub>3</sub> 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan akuabides sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/mL; 0,1 µg/mL; 0,2 µg/mL; 0,4 µg/mL; 0,8 µg/mL; 1,4 µg/mL dan 1,8 µg/mL Cd.
- i) Larutan baku 1 000 µg/mL Pb;  
larutkan 1,000 g Pb dengan 7 mL HNO<sub>3</sub> pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL kemudian encerkan dengan akuabides sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Pb 1 000 µg/mL siap pakai.
- j) Larutan baku 50 µg/mL Pb; dan  
pipet 5,0 mL larutan baku 1 000 µg/mL Pb ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan akuabides sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 50 µg/mL.
- k) Larutan baku kerja Pb;  
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,2 mL; 0,5 mL; 1 mL; 2 mL; 3 mL dan 4 mL larutan baku 50 µg/mL kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO<sub>3</sub> 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan akuabides sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/mL; 0,1 µg/mL; 0,25 µg/mL; 0,5 µg/mL; 1,0 µg/mL; 1,5 µg/mL dan 2,0 µg/mL Pb.

#### A.8.1.4 Cara kerja

- a) Timbang 10 g sampai dengan 20 g contoh (m) dengan teliti dalam cawan porselen/platina/kuarsa;
- b) tempatkan cawan berisi contoh di atas pemanas listrik dan panaskan secara bertahap sampai contoh tidak berasap lagi;
- c) lanjutkan pengabuan dalam tanur (450 ± 5) °C sampai abu berwarna putih, bebas dari karbon;
- d) apabila abu belum bebas dari karbon yang ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan dengan beberapa tetes air dan tambahkan tetes demi tetes HNO<sub>3</sub> pekat kira-kira 0,5 sampai dengan 3 mL;
- e) keringkan cawan di atas pemanas listrik dan masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu (450 ± 5) °C kemudian lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan HNO<sub>3</sub> pekat dapat diulangi apabila abu masih berwarna keabu-abuan;
- f) larutkan abu berwarna putih dalam 5 mL HCl 6 N, sambil dipanaskan di atas pemanas listrik atau penangas air sampai kering, kemudian larutkan dengan HNO<sub>3</sub> 0,1 N sebanyak 10 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 50 mL kemudian tepatkan hingga tanda garis dengan air suling (V), jika perlu, saring larutan menggunakan kertas saring, ke dalam botol polipropilen;
- g) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- h) baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimal sekitar 228,8 nm untuk Cd dan 283 nm untuk Pb;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C); dan
- k) hitung kandungan logam dalam contoh.



### A.8.1.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan logam (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

**Keterangan:**

C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ( $\mu\text{g/mL}$ );

V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (ml);

m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

### A.8.1.6 Ketelitian

Kisaran RSD (*relative standard deviation*) dari dua kali ulangan maksimal 16%. Jika RSD lebih besar dari 16%, maka uji harus diulang kembali.

## A.8.2 Timah (Sn)

### A.8.2.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan  $\text{HNO}_3$  dan  $\text{HCl}$  kemudian tambahkan  $\text{KCl}$  untuk mengurangi gangguan. Sn dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimal 235,5 nm dengan nyala oksidasi  $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$ .

### A.8.2.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Sn) terkalibrasi;
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian  $1^\circ\text{C}$ ;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Penangas air;
- Labu ukur 1 000 mL, 100 mL, dan 50 mL, terkalibrasi;
- Pipet ukur 10 mL dan 5 mL, berskala 0,1 mL, terkalibrasi;
- Erlenmeyer 250 mL;
- Gelas ukur 50 mL; dan
- Gelas piala 250 mL.

### A.8.2.3 Pereaksi

- Larutan kalium klorida ( $\text{KCl}$ ) 10 mg/mL;  
larutkan 1,91 g  $\text{KCl}$  dengan air suling menjadi 100 mL.
- Asam nitrat ( $\text{HNO}_3$ ) pekat;
- Asam klorida ( $\text{HCl}$ ) pekat;
- Larutan baku 1 000  $\mu\text{g/mL}$  Sn; dan  
larutkan 1,000 g Sn dengan 200 mL  $\text{HCl}$  pekat dalam labu ukur 1 000 mL, tambahkan 200 mL air suling, dinginkan pada suhu ruang dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan baku kerja Sn.  
pipet 10 mL  $\text{HCl}$  pekat dan 1,0 mL larutan  $\text{KCl}$  ke dalam masing-masing labu ukur 100 mL. Tambahkan masing-masing 0 mL; 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL; 2,0 mL dan 2,5 mL larutan baku 1 000  $\mu\text{g/mL}$  Sn dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0  $\mu\text{g/mL}$ ; 5  $\mu\text{g/mL}$ ; 10  $\mu\text{g/mL}$ ; 15  $\mu\text{g/mL}$ ; 20  $\mu\text{g/mL}$  dan 25  $\mu\text{g/mL}$  Sn.



#### A.8.2.4 Cara kerja

- Timbang 5 g sampai dengan 10 g contoh (W) dengan teliti ke dalam Erlenmeyer 250 mL, keringkan dalam oven 120 °C, tambahkan 30 mL HNO<sub>3</sub> pekat dan biarkan 15 menit (jangan tambahkan HNO<sub>3</sub> ke dalam contoh jika tahapan destruksi tidak dapat diselesaikan dalam hari yang sama);
- panaskan perlahan selama 15 menit di dalam lemari asam, hindari terjadinya percikan yang berlebihan;
- lanjutkan pemanasan sehingga sisa volume 3 mL sampai dengan 6 mL atau sampai contoh mulai kering pada bagian bawahnya, hindari terbentuknya arang;
- angkat Erlenmeyer dari pemanas listrik, tambahkan 25 mL HCl pekat, dan panaskan selama 15 menit sampai letupan dari uap Cl<sub>2</sub> berhenti;
- tingkatkan pemanasan dan didihkan sehingga sisa volume 10 mL sampai dengan 15 mL;
- tambahkan 40 mL air suling, aduk, dan tuangkan ke dalam labu ukur 100 mL, bilas Erlenmeyer tersebut dengan 10 mL aquabides (V);
- tambahkan 1,0 mL KCl, dinginkan pada suhu ruang, tepatkan dengan air suling sampai tanda garis dan saring;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- baca absorbansi larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimal 235,5 nm dengan nyala oksidasi N<sub>2</sub>O-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbansi sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kandungan Sn dalam contoh;

#### A.8.2.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan timah (Sn)(mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V$$

##### Keterangan:

C adalah konsentrasi timah (Sn) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter (µg/mL)

V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (ml); dan

W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

#### A.8.2.6 Ketelitian

Kisaran RSD (*relative standard deviation*) dari dua kali ulangan maksimal 16%. Jika RSD lebih besar dari 16%, maka uji harus diulang kembali.

### A.8.3 Merkuri (Hg)

#### A.8.3.1 Prinsip

Reaksi antara senyawa merkuri dengan NaBH<sub>4</sub> atau SnCl<sub>2</sub> dalam keadaan asam akan membentuk gas atomik Hg. Jumlah Hg yang terbentuk sebanding dengan absorbansi Hg yang dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) tanpa nyala pada panjang gelombang maksimal 253,7 nm.



**A.8.3.2 Peralatan**

- a) Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi lampu katoda Hg dan generator uap hidrida (HVG) terkalibrasi;
- b) *Microwave digester*;
- c) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) Pemanas listrik;
- e) Pendingin terbuat dari borosilikat, diameter 12 mm sampai dengan 18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin *Raschig* setinggi 100 mm, dan dilapisi dengan batu didih berdiameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm;
- f) Tabung destruksi;
- g) Labu destruksi 250 mL berdasar bulat;
- h) Labu ukur 1000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- i) Gelas ukur 25 mL;
- j) Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi; dan
- k) Gelas piala 500 mL.

**A.8.3.3 Pereaksi**

- a) Larutan asam sulfat ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 9 M;
- b) Larutan asam nitrat ( $\text{HNO}_3$ ) 7 M;
- c) Campuran asam nitrat: asam perklorat ( $\text{HNO}_3 : \text{HClO}_4$ ) 1:1;
- d) Hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) pekat;
- e) Larutan natrium molibdat ( $\text{NaMoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 2%;
- f) Larutan pereduksi;  
campurkan 50 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dengan 300 mL akuades dalam gelas piala 500 mL dan dinginkan sampai suhu ruang kemudian tambahkan 15 g NaCl, 15 g hidroksilamin sulfat, dan 25 g  $\text{SnCl}_2$ . Pindahkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan akuades sampai tanda garis.
- g) Larutan natrium borohidrida ( $\text{NaBH}_4$ );  
larutkan 3 g serbuk  $\text{NaBH}_4$  dan 3 g NaOH dengan akuades dalam labu ukur 500 mL.
- h) Larutan pengencer;  
masukkan 300 mL sampai dengan 500 mL akuades ke dalam labu ukur 1000 mL dan tambahkan 58 mL  $\text{HNO}_3$  kemudian tambahkan 67 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Encerkan dengan akuades sampai tanda garis dan kocok.
- i) Larutan baku 1000  $\mu\text{g/mL}$  Hg;  
larutkan 0,1354 g  $\text{HgCl}_2$  dengan kira-kira 25 mL akuades dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan akuades sampai tanda garis.
- j) Larutan baku 1  $\mu\text{g/mL}$  Hg; dan  
pipet 1 mL larutan baku 1000  $\mu\text{g/mL}$  Hg ke dalam labu ukur 1000 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis, kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 1  $\mu\text{g/mL}$ .
- k) Larutan baku kerja Hg; dan  
pipet masing-masing 0,25 mL; 0,5 mL; 1 mL; dan 2 mL larutan baku 1  $\mu\text{g/mL}$  ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,0025  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,005  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,01  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,02  $\mu\text{g/mL}$  Hg.
- l) Batu didih.



#### A.8.3.4 Cara kerja

##### A.8.3.4.1 Pengabuan basah

- Timbang 5 g contoh (W) dengan teliti ke dalam labu destruksi dan tambahkan 25 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  9 M, 20 mL  $\text{HNO}_3$  7 M, 1 mL larutan natrium molibdat 2%, dan 5 butir sampai dengan 6 butir batu didih;
- hubungkan labu destruksi dengan pendingin dan panaskan di atas pemanas listrik selama 1 jam. Hentikan pemanasan dan biarkan selama 15 menit;
- tambahkan 20 mL campuran asam nitrat: asam perklorat ( $\text{HNO}_3$  :  $\text{HClO}_4$ ) 1:1 melalui pendingin;
- hentikan aliran air pada pendingin dan panaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih. Lanjutkan pemanasan selama 10 menit dan dinginkan;
- tambahkan 10 mL akuades melalui pendingin dengan hati-hati sambil labu digoyang-goyangkan;
- didihkan lagi selama 10 menit;
- matikan pemanas listrik dan cuci pendingin dengan 15 mL akuades sebanyak 3 kali kemudian dinginkan sampai suhu ruang;
- pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 100 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan akuades sampai tanda garis (V);
- pipet 25 mL larutan di atas ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja Hg, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- baca absorbansi larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ( $\mu\text{g/mL}$ ) sebagai sumbu X dan absorbansi sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kandungan Hg dalam contoh.

##### A.8.3.4.2 Destruksi menggunakan *microwave digester* atau destruksi sistem tertutup

- Timbang 1 g contoh (W) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL  $\text{HNO}_3$ , 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  kemudian tutup rapat;
- masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 50 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan akuades sampai tanda garis (V);
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- baca absorbansi larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ( $\mu\text{g/mL}$ ) sebagai sumbu X dan absorbansi sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kandungan Hg dalam contoh.



### A.8.3.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan merkuri (Hg) (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V \times fp$$

**Keterangan:**

- C adalah konsentrasi merkuri (Hg) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ( $\mu\text{g/mL}$ );  
 V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);  
 W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);  
 fp adalah faktor pengenceran.

### A.8.3.6 Ketelitian

Kisaran RSD (*relative standard deviation*) dari dua kali ulangan maksimal 16%. Jika RSD lebih besar dari 16%, maka uji harus diulang kembali.

## A.9 Cemarkan arsen (As)

### A.9.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan  $\text{As}^{5+}$  direduksi dengan KI menjadi  $\text{As}^{3+}$  dan direaksikan dengan  $\text{NaBH}_4$  atau  $\text{SnCl}_2$  sehingga terbentuk  $\text{AsH}_3$  yang kemudian dibaca dengan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimal 193,7 nm.

### A.9.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap hidrida (HVG) terkalibrasi;
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian  $1^\circ\text{C}$ ;
- Microwave digester*;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Burner* atau *bunsen*;
- Labu *Kjeldahl* 250 mL;
- Labu terbuat dari borosilikat berdasar bulat 50 mL;
- Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- Gelas ukur 25 mL;
- Pipet volumetrik 25 mL terkalibrasi;
- Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;
- Cawan porselen 50 mL; dan
- Gelas piala 200 mL.

### A.9.3 Pereaksi

- Asam nitrat,  $\text{HNO}_3$  pekat;
- Asam sulfat,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat;
- Asam perklorat,  $\text{HClO}_4$  pekat;
- Ammonium oksalat,  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$  jenuh;
- Hidrogen peroksida,  $\text{H}_2\text{O}_2$  pekat;
- Larutan natrium borohidrida,  $\text{NaBH}_4$  4%;  
 larutkan 3 g  $\text{NaBH}_4$  dan 3 g  $\text{NaOH}$  dengan akuades sampai tanda garis dalam labu ukur 500 mL.



- g) Larutan asam klorida, HCl 8 M;  
larutkan 66 mL HCl pekat kedalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan akuades sampai tanda garis.
- h) Larutan timah (II) klorida,  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  10%;  
timbang 50 g  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ke dalam gelas piala 200 mL dan tambahkan 100 mL HCl pekat. Panaskan hingga larutan jernih dan dinginkan kemudian tuangkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan akuades sampai tanda garis.
- i) Larutan kalium iodida, KI 20%;  
timbang 20 g KI ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan akuades sampai tanda garis (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).
- j) Larutan  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  75 mg/mL;  
larutkan 3,75 g MgO dengan 30 mL  $\text{H}_2\text{O}$  secara hati-hati, tambahkan 10 mL  $\text{HNO}_3$ , dinginkan dan encerkan hingga 50 mL dengan akuades;
- k) Larutan baku 1000  $\mu\text{g/mL}$  As;  
larutkan 1,3203 g  $\text{As}_2\text{O}_3$  kering dengan sedikit NaOH 20% dan netralkan dengan HCl atau  $\text{HNO}_3$  1:1 (1 bagian asam : 1 bagian air). Masukkan ke dalam labu ukur 1000 mL dan encerkan dengan akuades sampai tanda garis.
- l) Larutan baku 100  $\mu\text{g/mL}$  As;  
pipet 10 mL larutan baku As 1000  $\mu\text{g/mL}$  ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan akuades sampai tanda garis. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100  $\mu\text{g/mL}$  As.
- m) Larutan baku 1  $\mu\text{g/mL}$  As; dan  
pipet 1 mL larutan baku As 100  $\mu\text{g/mL}$  ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan akuades sampai tanda garis. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 1  $\mu\text{g/mL}$  As.
- n) Larutan baku kerja As.  
pipet masing-masing 1,0 mL; 2,0 mL; 3,0 mL; 4,0 mL dan 5,0 mL larutan baku 1  $\mu\text{g/mL}$  As ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan akuades sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,01  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,02  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,03  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,04  $\mu\text{g/mL}$  dan 0,05  $\mu\text{g/mL}$  As.

#### A.9.4 Cara kerja

##### A.9.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g sampai dengan 10 g contoh (W) ke dalam labu *Kjeldahl* 250 mL, tambahkan 5 mL sampai dengan 10 mL  $\text{HNO}_3$  pekat dan 4 mL sampai dengan 8 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat dengan hati-hati;
- b) setelah reaksi selesai, panaskan dan tambahkan  $\text{HNO}_3$  pekat sedikit demi sedikit sehingga contoh berwarna coklat atau kehitaman;
- c) tambahkan 2 mL  $\text{HClO}_4$  70% sedikit demi sedikit dan panaskan lagi sehingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangan setelah penambahan  $\text{HClO}_4$ , tambahkan lagi sedikit  $\text{HNO}_3$  pekat);
- d) dinginkan, tambahkan 15 mL  $\text{H}_2\text{O}$  dan 5 mL  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$  jenuh;
- e) panaskan sehingga timbul uap  $\text{SO}_3$  di leher labu;
- f) dinginkan, pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- g) pipet 25 mL larutan diatas dan tambahkan 2 mL HCl 8 M, 0,1 mL KI 20% kemudian kocok dan biarkan minimal 2 menit;
- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) tambahkan larutan pereduksi ( $\text{NaBH}_4$ ) ke dalam larutan baku kerja As, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- j) baca absorbansi larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 193,7 nm;



- k) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ( $\mu\text{g/mL}$ ) sebagai sumbu X dan absorbansi sebagai sumbu Y;
- l) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- m) lakukan pengerjaan duplo; dan
- n) hitung kandungan As dalam contoh.

#### A.9.4.2 Destruksi menggunakan *microwave digester* atau destruksi sistem tertutup

- a) Timbang 1 g contoh (W) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL  $\text{HNO}_3$ , 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  kemudian tutup rapat.
- b) masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) setelah dingin, pindahkan larutan destruksi ke dalam labu ukur 25 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- d) pipet 10 mL larutan destruksi ke dalam labu borosilikat berdasar bulat 50 mL, tambahkan 1 mL larutan  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ , uapkan di atas pemanas listrik hingga kering dan arangkan. Abukan dalam tanur dengan suhu  $450^\circ\text{C}$  ( $\pm 1$  jam);
- e) dinginkan, larutkan dengan 2,0 mL  $\text{HCl}$  8 M, 0,1 mL  $\text{KI}$  20 % dan biarkan minimal 2 menit. Tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung contoh pada alat;
- f) siapkan  $\text{NaBH}_4$  dan  $\text{HCl}$  dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan oleh alat;
- g) tuangkan larutan baku kerja As 0,01  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,02  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,03  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,04  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,05  $\mu\text{g/mL}$  serta blanko ke dalam 6 tabung contoh lainnya. Nyalakan *burner* atau *bunsen* serta tombol pengatur aliran pereaksi dan aliran contoh;
- h) baca nilai absorbansi tertinggi larutan baku kerja As dan contoh dengan blanko sebagai koreksi;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi As ( $\mu\text{g/mL}$ ) sebagai sumbu X dan absorbansi sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- k) lakukan pengerjaan duplo; dan
- l) hitung kandungan As dalam contoh.

#### A.9.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan arsen (As)}(\text{mg/kg}) = \frac{C}{W} \times V \times fp$$

##### Keterangan:

- C adalah konsentrasi arsen (As) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ( $\mu\text{g/mL}$ );
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
- W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
- fp adalah faktor pengenceran.

#### A.9.6 Ketelitian

Kisaran RSD (*relative standard deviation*) dari dua kali ulangan maksimal 16%. Jika RSD lebih besar dari 16%, maka uji harus diulang kembali.



## A.10 Cemaran mikroba

### A.10.1 Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji Angka Lempeng Total dan Kapang Khamir

#### A.10.1.1 Prinsip

Pembebasan sel-sel bakteri yang mungkin terlindung oleh partikel makanan dan untuk menggiatkan kembali sel-sel bakteri yang mungkin viabilitasnya berkurang karena kondisi yang kurang menguntungkan dalam makanan. Persiapan dan homogenisasi contoh bertujuan agar bakteri terdistribusi dengan baik di dalam contoh makanan yang ditetapkan.

#### A.10.1.2 Peralatan

- Alat homogenisasi (blender) dengan kecepatan putaran 10 000 rpm sampai dengan 12 000 rpm;
- Otoklaf;
- Neraca analitik kapasitas 2 000 g terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- Pemanas listrik;
- Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- Gelas piala steril;
- Erlenmeyer steril;
- Botol pengencer steril;
- Pipet volumetrik steril 10,0 mL dan 1,0 mL terkalibrasi, dilengkapi dengan *bulb* dan *pipettor*;
- Tabung reaksi; dan
- Sendok, gunting, dan spatula steril.

#### A.10.1.3 Larutan pengencer untuk Angka Lempeng Total

*Buffered peptone water (BPW)*

- Peptone	10 g
- Natrium klorida	5 g
- Disodium hidrogen fosfat	3,5 g
- Kalium dihidrogen fosfat	1,5 g
- Air suling	1 L

Larutkan bahan-bahan di atas menjadi 1 L dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol pengencer. Sterilkan menggunakan otoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

#### A.10.1.4 Larutan pengencer untuk kapang

Peptone 0,1 %

- Peptone	1 g
- Air suling	1 L

Larutkan bahan-bahan dalam 1 L air suling, atur pH 7,0, masukkan 225 mL atau 450 mL ke dalam botol (labu) 500 mL dan 9 mL ke dalam tabung reaksi. Sterilkan pada suhu 121 °C selama 20 menit.

#### A.10.1.5 Homogenisasi contoh untuk ALT

- Timbang 25 g contoh secara aseptik ke dalam botol pengencer yang telah berisi 225 mL larutan pengencer steril sehingga diperoleh pengenceran 1:10; dan
- kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.



**A.10.1.6 Homogenisasi contoh untuk kapang**

- a) Timbang 25 g contoh secara aseptik ke dalam botol pengencer yang telah berisi 225 mL larutan pengencer steril sehingga diperoleh pengenceran 1:10; dan
- b) kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

**A.10.2 Angka lempeng total****A.10.2.1 Prinsip**

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 72 jam pada suhu  $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$ .

**A.10.2.2 Peralatan**

- a) Inkubator  $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$ , terkalibrasi;
- b) Oven/alat sterilisasi kering terkalibrasi;
- c) Otoklaf;
- d) Penangas air bersirkulasi  $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ ;
- e) Alat penghitung koloni;
- f) Botol pengencer 160 mL terbuat dari gelas borosilikat, dengan sumbat karet atau tutup ulir plastik;
- g) Pipet ukur 1 mL steril dengan skala 0,1 mL dilengkapi *bulb* dan *pipettor*; dan
- h) Cawan Petri gelas/plastik (berukuran minimal 15 mm x 90 mm), steril.

**A.10.2.3 Pembenihan dan pengencer**

- a) *Buffered peptone water* (BPW)
 

– Peptone	10 g
– Natrium klorida	5 g
– Dinatrium hidrogen fosfat	3,5 g
– Kalium dihidrogen fosfat	1,5 g
– Air suling	1 L

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1 000 mL dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol pengencer. Sterilkan dengan menggunakan otoklaf pada suhu  $121 ^\circ\text{C}$  selama 15 menit.

- b) *Plate count agar* (PCA)
 

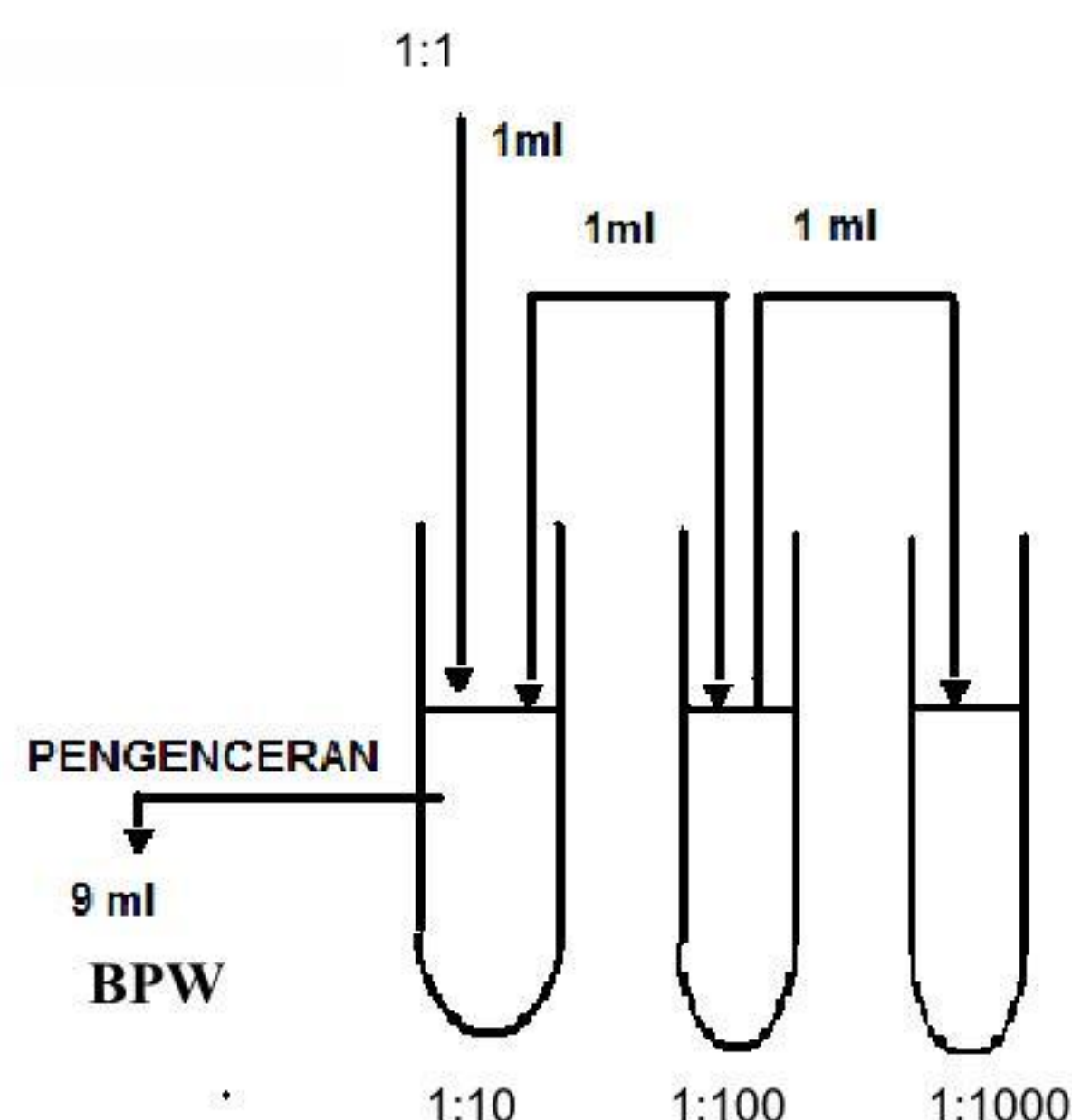
– <i>Yeast extract</i>	2,5 g
– <i>Pancreatic digest of caseine</i>	5 g
– Glukosa	1 g
– Agar	15 sampai dengan 20 g
– Air suling	1 L

Larutkan semua bahan-bahan, atur pH 7,0. Masukkan dalam labu, sterilkan pada  $121 ^\circ\text{C}$  selama 15 menit.

**A.10.2.4 Cara kerja**

- a) Timbang 25 g contoh, masukkan ke dalam Erlenmeyer yang telah berisi 225 mL larutan pengencer hingga diperoleh pengenceran 1:10. Kocok campuran beberapa kali hingga homogen. Pengenceran dilakukan sampai tingkat pengenceran tertentu sesuai keperluan seperti pada Gambar A.1.





**Gambar A.1 - Tingkat pengenceran menggunakan larutan pengencer *Buffered Peptone Water* (BPW).**

- Pipet masing-masing 1 mL dari pengenceran  $10^{-1}$  sampai dengan  $10^{-4}$  atau sesuai keperluan ke dalam cawan Petri steril secara duplo.
- Ke dalam setiap cawan Petri tuangkan sebanyak 12 mL sampai dengan 15 mL media PCA yang telah dicairkan yang bersuhu  $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$  dalam waktu 15 menit dari pengenceran pertama.
- Goyangkan cawan Petri dengan hati-hati (putar dan goyangkan ke depan dan ke belakang serta ke kanan dan ke kiri) hingga contoh tercampur rata dengan pembedihan.
- Kerjakan pemeriksaan blanko dengan mencampur air pengencer dengan pembedihan untuk setiap contoh yang diperiksa.
- Biarkan hingga campuran dalam cawan Petri membeku.
- Masukkan semua cawan Petri dengan posisi terbalik ke dalam lemari pengering dan inkubasikan pada suhu  $30 ^\circ\text{C}$  selama 72 jam.
- Catat pertumbuhan koloni pada setiap cawan Petri yang mengandung (25 - 250) koloni setelah 48 jam.
- Hitung angka lempeng total dalam 1 mL contoh dengan mengalikan jumlah rata-rata koloni pada cawan Petri dengan faktor pengenceran yang digunakan.

#### A.10.2.5 Perhitungan

Angka lempeng total (koloni/mL) =  $n \times F$

##### Keterangan:

- n adalah rata – rata koloni dari dua cawan Petri dari satu pengenceran, dinyatakan dalam koloni per mL (koloni/mL);  
F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai

#### A.10.2.6 Pernyataan hasil

##### A.10.2.6.1 Cara menghitung

- Pilih cawan Petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni setiap cawan Petri. Hitung semua koloni dalam cawan Petri menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;
- jika salah satu dari dua cawan Petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 koloni atau lebih besar dari 250 koloni, hitung jumlah koloni yang terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;



Contoh :

$10^{-2}$	$10^{-3}$
120	25
105	20

$$ALT = \frac{120 + 105 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 1) \times 10^{-2}]} = 124,9375$$

- c) jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran koloni per g dengan rumus :

$$ALT = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times d]}$$

**Keterangan:**

- C adalah jumlah koloni dari tiap-tiap cawan Petri;  
 $n_1$  adalah jumlah cawan Petri dari pengenceran pertama yang dihitung;  
 $n_2$  adalah jumlah cawan Petri dari pengenceran kedua;  
d adalah pengenceran pertama yang dihitung;

Contoh :

$10^{-2}$	$10^{-3}$
131	30
143	25

$$ALT = \frac{131 + 143 + 30 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2) \times 10^{-2}]} = 164,3357$$

- d) jika jumlah koloni dari masing-masing cawan Petri lebih dari 25 koloni nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan;  
– jika jumlah koloni per  $\text{cm}^2$  kurang dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya sebagai jumlah perkiraan : jumlah bakteri dikalikan faktor pengenceran.

Contoh :

$10^{-2}$	$10^{-3}$	Jumlah bakteri perkiraan
~	640	$1\,000 \times 640 = 640\,000 (6.4 \times 10^5)$

- jika jumlah koloni per  $\text{cm}^2$  lebih dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya:  
area x faktor pengenceran x 100 contoh rata-rata jumlah koloni 110 per  $\text{cm}^2$

Contoh :

$10^{-2}$	$10^{-3}$	area ( $\text{cm}^2$ )	jumlah bakteri perkiraan
~	7 150	65	$> 65 \times 10^3 \times 100 = > 6\,500\,000 (6.5 \times 10^6)$
~	6 490	59	$> 59 \times 10^3 \times 100 = > 5\,900\,000 (5.9 \times 10^6)$

- e) jika jumlah koloni dari masing-masing koloni yang tumbuh pada cawan Petri kurang dari 25, maka nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari 25 koloni dikalikan pengenceran yang terendah; dan  
f) menghitung koloni yang merambat.  
Perambatan pada koloni ada 3 macam, yaitu :  
– perambatan berupa rantai yang tidak terpisah;  
– perambatan yang terjadi diantara dasar cawan Petri dan pembenihan; dan  
– perambatan yang terjadi pada pinggir atau permukaan pembenihan.  
Jika terjadi hanya satu perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap satu. Jika terbentuk lebih dari satu perambatan dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka tiap sumber dihitung sebagai satu koloni.  
g) jika tidak ada koloni yang tumbuh pada cawan petri, nyatakan hasil sebagai nol koloni per gram dikalikan dengan faktor pengenceran terendah ( $<10$ ).



#### A.10.2.6.2 Cara membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri):

- Jika angka ketiga lebih besar dari 5, maka bulatkan ke atas;  
contohnya : 528 dilaporkan sebagai 530 penulisannya  $5,3 \times 10^2$
- Jika angka ketiga kurang dari 5, maka bulatkan kebawah; dan  
contohnya : 523 dilaporkan sebagai 520 penulisannya  $5,2 \times 10^2$
- Jika angka ketiga sama dengan 5, maka bulatkan sebagai berikut:
  - bulatkan ke atas jika angka kedua merupakan angka ganjil; dan  
contohnya : 575 dilaporkan sebagai 580 penulisannya  $5,8 \times 10^2$
  - bulatkan ke bawah jika angka kedua merupakan angka genap.  
contohnya : 565 dilaporkan sebagai 560 penulisannya  $5,6 \times 10^2$

### A.11 Okratoksin A

#### A.11.1.1 Prinsip

Okratoksin A (OTA) dipisahkan dengan diekstraksi secara selektif menggunakan *Immuno Affinity Column* (IAC), ditetapkan secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).

#### A.11.2 Peralatan

- Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT);
- Ultrasonic bath*;
- Kertas saring standar kromatografi dengan ukuran *particle retention* 8  $\mu\text{m}$ ;
- Pipet volumetrik 20 mL terkalibrasi;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pipet mikro 50  $\mu\text{L}$ , 5  $\mu\text{L}$  terkalibrasi;
- Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- Gelas piala 200 mL terkalibrasi; dan
- Vorteks;

#### A.11.3 Pereaksi

- Bahan penderivatisasi: *methyl esterification* ( $\text{BF}_3$  80 °C, 10 mm);
- Immuno Affinity Column*, IAC;
- Phosphate Buffer Saline*, PBS;
- Natrium Hidrogen Karbonat,  $\text{NaHCO}_3$ ;
- Metanol,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ; dan
- Asetonitril;

#### A.11.4 Cara Kerja

##### A.11.4.1 Ekstraksi contoh kopi instan

- Timbang 25 g contoh dengan ketelitian 0,01 g;
- tambahkan 200 mL campuran metanol : 3%  $\text{NaHCO}_3$  dengan perbandingan 50 :50;
- homogenisasi dalam *ultrasonic bath* selama 8 menit;
- saring dengan kertas saring berukuran partikel 8  $\mu\text{m}$  pada kondisi vakum hingga diperoleh filtrat.



**A.11.4.2 Purifikasi contoh uji**

- Pipet filtrat 4 mL, encerkan hingga 100 mL dengan PBS;
- set IAC pada vakum *manifold* dan filtrat encer yang diperoleh dilewatkan ke dalam IAC dengan kecepatan 2 sampai dengan 3 mL per menit, cuci IAC dengan 10 mL air;
- lepas IAC, elusi OTA dengan 4 mL metanol (gunakan *syringe*), biarkan kontak metanol selama 3 menit, *backflushing* sebanyak 3 kali; dan
- tampung hasil elusi metanol dari IAC pada botol kecil.

**A.11.4.3 Prosedur derivatisasi****A.11.4.3.1 Derivatisasi contoh uji**

- Keringkan hasil elusi dengan aliran nitrogen dengan pemanasan 40 °C;
- tambahkan residu dengan 50 µL *methyl esterification* (BF<sub>3</sub> 80 °C, 10 mm kemudian vorteks selama 30 detik;
- larutkan ekstrak kering dengan 150 µL HPLC *mobile phase* (air : asetonitril : metanol dengan perbandingan 60 : 20 : 20);
- saring dengan -0,22 µm PTFE filter;
- injeksikan 20 µL aliquat (A) ke KCKT

**A.11.4.3.2 Derivatisasi Baku**

- Pipet baku campuran 200 ng / mL sebanyak 5 µL, 10 µL, 20 µL, 40 µL, dan 50 µL;
- uapkan pelarut dengan nitrogen hingga terbentuk residu;
- tambahkan residu dengan 50 µL *methyl esterification* (BF<sub>3</sub> 80 °C, 10 mm kemudian vorteks selama 30 detik;
- tambahkan dengan 950 µL campuran asetonitril dan air (9 : 1) kemudian vorteks selama 30 detik;
- injeksikan 20 µL aliquat (A) ke KCKT.

**A.11.5 Cara penetapan**

Larutan A dan B masing-masing disuntikkan terpisah dan dilakukan KCKT dengan kondisi sebagai berikut:

- Kolom STR ODS-II (panjang kolom 25 cm, diameter dalam 4,6 mm) atau yang sesuai
- Fase gerak : asetonitril – NaAc / *Acetics* (19 : 1) (45 :55)
- Laju alir : 1 mL per menit
- Detektor : Fluoresens, λ Eksitasi sebesar 330 nm dan λ Emisi sebesar 470 nm
- Volume penyuntikan : masing-masing 30 µL

**A.11.6 Interpretasi Hasil**

Kadar Okratoksin A dalam larutan uji dihitung menggunakan persamaan garis kurva kalibrasi baku okratoksin A.

$$\text{Kadar okratoksin A} = C_{\text{sp}} \times \frac{F}{W}$$

**Keterangan:**

- $C_{\text{sp}}$  adalah kadar okratoksin A yang diperoleh dari perhitungan menggunakan kurva kalibrasi (ng/mL) ;
- F adalah faktor pengenceran, dan
- W adalah bobot sampel (g).



## Bibliografi

- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 900.02, Ash of Sugars and Syrups*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 44.1.05.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 920.93, Ash of Roasted Coffee*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 30.1.08.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 962.13, Caffeine in Nonalcoholic Beverages*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 29.1.17.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 967.19, Water in Dried Vegetables*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 42.2.1.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 971.21, Mercury in Foods, Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 9.2.22.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 974.14, Mercury in Fish, Alternative Digestion Method*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 9.2.24.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 979.11, Caffeine in, Roasted Coffee, Chromatographic – Spectrophotometric Method*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 30.1.12.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 979.12, Moisture (Loss on Drying) in Roasted Coffee*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 30.1.20.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 986.15, Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium, and Zinc in Human and Pet Foods, Multielement Method*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 9.1.01.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 999.11, Lead, Cadmium, Copper, Iron, and Zinc in foods: Absorption Spectrophotometry after Dry Ashing*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 9.1.09.
- Egan, H., Ronald S. Kirk, dan Ronald Sawyer. 1981. *Pearson's Chemical Analysis of Foods. Beverages and Chocolates*. 8<sup>th</sup> Edition. Chapter 10.
- ISO 20938: 2008, *Instant Coffee – Determination of Moisture Content – Karl Fischer Method (Reference Method)*. 1<sup>st</sup> Edition.
- ISO 20481: 2008, *Coffee and Coffee Products – Determination of the Caffeine Content Using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) – Reference Method*. 1<sup>st</sup> Edition.
- ISO 24114: 2011, *Instant coffee – Criteria for authenticity*. 1<sup>st</sup> Edition.
- ISO 11292: 1995, *Instant coffee – Determination of free and total carbohydrate contents – Methods using high- performance anion exchange chromatography*. 2<sup>nd</sup> Edition.
- Manual of Methods of Analysis of Foods. 2005. *Beverages (Coffee, Tea, Cocoa, Chicory), Sugar and Sugar Products and Confectionery Products*. Directorate General of Health Services, Ministry of Health and Family Welfare, Government of India.
- SNI 7387: 2009. Batas maksimum cemaran logam berat dalam pangan
- SNI 7388 : 2009. Batas maksimum cemaran mikroba dalam pangan.
- Visconti A, Pascale, M, Centonze, G (2000). Determination of ochratoxinA in domestic and imported beers in Italy by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography. *J Chromatography A* 888: 321-326. Di dalam Ismayadi, C. 2011. Pengembangan Analisis Mikotoksin: OTA dan Aflatoksin. Indonesian Coffee and Cocoa Research Institute.